

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/066574 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C09K 11/06,
11/08, 11/18, H01L 31/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/00556

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Februar 2002 (12.02.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 08 808.6 16. Februar 2001 (16.02.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: ENDERLEIN, Jörg [DE/DE]; Fürbringer-
strasse 6, 10961 Berlin (DE). KUHNERT, Lothar
[DE/DE]; Frankenbergrasse 36, 12589 Berlin (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: KUHNERT, Lothar; Franken-
bergrasse 36, 12589 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Identität des Erfinders (Regel 4.17 Ziffer i)
für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle
Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für alle
Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Prior-
ität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17
Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Prior-
ität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17
Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten

Veröffentlicht:

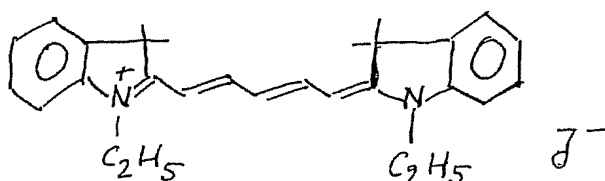
- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: FLUORESCENT MICROPARTICLES

(54) Bezeichnung: FLUORESZIERENDE MIKROTEILCHEN

A Farbstoff F.1



A DYE F1

(57) Abstract: The invention relates to fluorescent
microparticles whose core consists of polymer particles
and dyes incorporated therein or of semiconducting
crystals and which are coated with a metallic
conducting material. The invention further relates to a
method for producing the inventive microparticles and
to uses of said microparticles in analytics especially
in the field of biology and medicine. The inventive
microparticles are characterized by their improved
photostability and higher fluorescence intensity
(fluorescence brightness).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft fluo-
reszierende Mikroteilchen, die im Kern aus Polymerteil-
chen mit inkorporierten Farbstoffen oder aus Halbleiter-

kristallen bestehen und mit metallisch leitenden Material beschichtet sind, ferner ein Verfahren zur Herstellung dieser Mikroteilchen und Anwendungen dieser Mikroteilchen in der Analytik insbesondere in Biologie und Medizin. Die erfindungsgemäßen Mikroteilchen zeichnen sich durch verbesserte Photostabilität und höhere Fluoreszenzintensität (Fluoreszenzhelligkeit) aus.

WO 02/066574 A1



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Fluoreszierende Mikroteilchen

Die Erfindung betrifft fluoreszierende Mikroteilchen, die im Kern aus Polymerteilchen mit inkorporierten Farbstoffen oder aus Halbleiterkristallen bestehen und mit metallisch leitenden Material beschichtet sind, ferner ein Verfahren zur Herstellung dieser Mikroteilchen und Anwendungen dieser Mikroteilchen in der Analytik insbesondere in Biologie und Medizin. Die erfindungsgemäßen Mikroteilchen zeichnen sich durch verbesserte Photostabilität und höhere Fluoreszenzintensität (Fluoreszenzhelligkeit) aus.

Fluoreszierende Mikroteilchen sind aus der Literatur bekannt und haben ein breites Anwendungsgebiet in der Analytik besonders beim Nachweis biologisch relevanter Materialien gefunden. So werden in EP 0 596 098 fluoreszierende Mikropartikel beschrieben, bei denen Fluoreszenzfarbstoffe in Polymere eingebettet und entsprechend ausgerüstet in der biologischen Analytik eingesetzt werden. Analoge Materialien werden auch in USP 2 994 679 und USP 3 096 333 erwähnt.

Derartige fluoreszierende Mikroteilchen finden vielfältige Anwendungen in der Biologie und Medizin, da man an ihre Oberfläche biologisch aktive Materialien chemisch oder physikalisch adsorptiv anbinden kann. Auf diese Weise gelabelt, dienen die fluoreszierenden Mikropartikel als Marker oder Tracer für den Nachweis des biologischen Materials.

So werden in Circulation 83, 974 (1991) Blutflußmessungen mit Hilfe derartiger Mikropartikel beschrieben. In J. Microbiol. Meth. 13, 135, (1991) wird das Verhalten von Bakterien untersucht. Weitere Beispiele sind die Anwendung in Immunoassays (Anal. Biochem. 272, 165, (1999)) und der Nucleinsäureanalytik (Anal. Biochem. 198, 308, (1991), Nucleic Acid Res. 15, 2891, (1987)). Eine zusammenfassende Darstellung von Anwendungen befindet sich in: R.P. Haughland: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 7. Aufl. Molecular Probes, 1999.

Bekannt ist auch die Verwendung von Halbleitermikrokristallen mit Teilchengrößen im Nanometerbereich sogenannter Quantum Dots für den gleichen Anwendungszweck (WO 99/26 269, WO 00/17 642).

Diese in der Literatur bisher beschriebenen fluoreszierenden Mikroteilchen haben jedoch mindestens zwei grundsätzliche Nachteile. Zum einen besitzen die inkorporierten Farbstoffe eine ungenügende Photostabilität und zum anderen ist die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts (Helligkeit) oft ungenügend. Dadurch ist ihre Anwendung insbesondere bei hochsensitiven Messungen eingeschränkt. Beispielsweise muß ein sehr hoher apparativer Aufwand hinsichtlich der Lasertechnik und Elektronik bei der Anwendung der Mehrphotonenanregung, z.B. Zweiphotonanregung, betrieben werden. Die Methode der Zweiphotonanregung im langwelligen Bereich oberhalb von 600 nm und die Detektion des Fluoreszenzlichts kurzwellig ist besonders attraktiv, da bei dieser Meßmethode nur eine sehr geringe Untergrundstrahlung auftritt.

Aufgabe der Erfindung ist es deshalb, fluoreszierende Mikroteilchen mit wesentlich verbesserter Fluoreszenzhelligkeit und Photostabilität, die den Einsatz hochempfindlicher Nachweisverfahren mit einfachen Mitteln gestatten, aufzufinden und Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung anzugeben.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch fluoreszierende Mikroteilchen mit den Merkmalen des Anspruchs 1 bzw. Herstellungsverfahren nach Anspruch 21 und Verwendung nach Anspruch 28 gelöst.

Nachfolgend wird die Erfindung näher erläutert. Die erfindungsgemäßen fluoreszierenden Mikroteilchen enthalten einen Kern eines fluoreszierenden Materials, der aus Polymerpartikeln, die mit organischen Farbstoffen beladen sind oder aus Halbleitermikrokristallen, besteht. Diese fluoreszierenden Kernteilchen werden mit einem bei den optischen Frequenzen der Anregung und Fluoreszenz metallisch leitenden Material beschichtet. In Abhängigkeit vom Durchmesser des fluoreszierenden Kerns, der Art des metallisch leitenden Materials und dessen Schichtdicke werden die Intensität des abgestrahlten Fluoreszenzlichts und/oder die Photostabilität, der im Kern befindlichen Farbstoffe wesentlich erhöht. Diese bemerkenswerte Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften tritt sowohl bei Einphotonen- als auch bei Mehrphotonenanregung auf. Im Detail hängt diese Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften von der Art des metallisch leitenden Materials, dem Durchmesser des Kerns und der Schichtdicke des aufgetragenen Metalls ab. So wurde gefunden, daß Gold, Silber, Kupfer oder Aluminium sich besonders gut eignen. Der Durchmesser des fluoreszierenden Kerns liegt bevorzugt im Bereich von 10 bis 90 nm und die Schichtdicke des metallisch leitenden Materials beträgt bevorzugt 1 bis 10 nm. Verwendet man Silber als metallisch leitendes Material, so ist der besonders bevorzugte Durchmesser des Kerns 10 bis 50 nm. Die gleichen Effekte der Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften treten auch auf, wenn der Kern der fluoreszierenden Mikroteilchen aus Halbleitermaterial, wie CdS, CdSe, CdTe, ZnS, ZnSe, ZnTe, InP, InAs besteht.

Als fluoreszenzfähige organische Farbstoffe eignen sich Farbstoffe aus den Stoffklassen der Cumarine, Oxazine, Thiazine, Rhodamine, Dibenzpyrane, Polymethine wie Cyanine, Phthalocyanine oder Kombinationen davon.

Diese Farbstoffe werden in Polymermaterial eingebracht, wofür sich Polymere oder Copolymere von Styrol, Divinylbenzol, Acrylnitril oder Methacrylnitril, Acrylamid oder Methacrylamid, Acrylsäure- oder Methacrylsäureester, Maleinsäurederivaten, Vinylacetat, Vinylchlorid, ferner Cellulosederivate, Agarose, Polyurethan, Polyhydroxybuttersäure, Polylactide eignen.

Geeignet sind ebenfalls vernetzte Polymere mit anionen- oder kationenaustauschenden Gruppen.

Vorteilhaft werden die metallisch beschichteten fluoreszierenden Mikroteilchen mit einer Schutzschicht aus Oxiden oder Sulfiden überzogen. Geeignet sind aber auch Polysulfide oder andere thiolgruppenenthaltende Substanzen. Gleichfalls können die metallisierten Mikroteilchen mit Eiweißkörpern wie Albumin adsorptiv beschichtet werden. Auf diese Weise und durch Beschichtung mit anderen Substanzen oder chemische Reaktion erhalten die Mikroteilchen funktionelle Kopplungsgruppen wie Hydroxyl, Amin, Amid, Imid, Carbonsäureanhydrid, Sulfhydryl, Sulfonat, Aldehyd, Azid, Chinonazid.

An diese funktionelle Gruppen oder durch vorherige Beschichtung können auch biologisch aktive Substanzen wie Biotin, Avidin, Streptavidin, oder Nucleinsäureverbindungen angebracht werden.

Auf diese Weise mit einer chemisch aktiven Oberfläche ausgerüstet, eignen sich die erfindungsgemäßen fluoreszierenden Mikroteilchen für eine Vielzahl von analytischen Anwendungen.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen fluoreszierenden Mikroteilchen erfolgt in mehreren Schritten.

Im ersten Schritt werden die Kernteilchen mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 5 bis 100 nm, die aus mit Farbstoffen beladenen Polymerteilchen oder Halbleitermikrokristallen bestehen, präpariert.

In einer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden hydrophobe in Wasser praktisch unlösliche Farbstoffe gemeinsam mit dem ebenfalls in Wasser unlöslichen Poly-

mermaterial in einem organischen mit Wasser ebenfalls nur beschränkt mischbaren Lösungsmittel gelöst. Dabei werden Lösungsmittel verwendet, deren Siedepunkt niedriger als der von Wasser ist. Geeignet sind beispielsweise Methylenchlorid, Chloroform, Dichlorethan, Tetrachlorkohlenstoff, Trichlorethylen, Benzol, Cyclohexan.

Als Polymermaterial werden verwendet Polymere oder Copolymere von Styrol, Divinylbenzol, Acrylnitril oder Methacrylnitril, Acrylsäure- oder Methacrylsäureester, Maleinsäurederivaten, Vinylacetat, Vinylchlorid, ferner wasserunlösliche Cellulosederivate, Polyurethan, Polyhydroxybuttersäure, Polylactide, Polyvinylalkohol, Gelatine, Agarose.

Nach Zugabe von grenzflächenaktiven Stoffen als Emulgierhilfsmittel, die sowohl zu der organischen als auch zu der wässrigen Phase oder zu beiden Phasen erfolgen kann, werden beide Phasen unter Anwendung eines hochtourigen Rührwerks intensiv vermischt, so daß sich eine feinteilige Emulsion bildet. In der kontinuierlichen Wasserphase feinverteilt befinden sich die Tröpfchen des Lösungsmittels, die das Polymermaterial und den Farbstoff enthalten. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels verfestigen sich diese Tröpfchen zu sphäroiden Mikroteilchen. Diese können z.B. durch Zentrifugieren isoliert, gewaschen und entsprechend weiterverarbeitet werden.

Bei der Herstellung von Kernteilchen, die hydrophile Polymere wie Agarose, Polyacrylamid, wasserlösliche Cellulosederivate, Polyvinylalkohol, Gelatine und hydrophile Farbstoffe enthalten, geht man umgekehrt vor. Man löst die Polymeren und die Farbstoffe in Wasser und emulgiert diese Lösung wieder unter Anwendung von grenzflächenaktiven Stoffen in einem organischen Lösungsmittel, dessen Siedepunkt oberhalb des Siedepunktes von Wasser liegt. Geeignet sind hierfür beispielsweise Toluol, Ethylbenzol, Xylol, Cumol. Nach dem Vermischen beider Phasen unter Einsatz eines hochtourigen Rührwerks wird eine feinteilige Emulsion mit dem organischen Lösungsmittel als kontinuierliche Phase erhalten. In den feinverteilten Wassertropfen befinden sich das Polymermaterial und die Farbstoffe. Nach Abdestillieren des Wassers verfestigen sich diese Tröpfchen zu sphäroiden Mikroteilchen. Diese werden wieder durch Zentrifugieren isoliert.

Erfindungsgemäß lassen sich auch polymere Mikroteilchen, die an ihrer Oberfläche anionen- oder kationenaustauschende Gruppen enthalten, wie entsprechend modifizierte Styrol-Divinyl-Copolymere, mit ionischen Farbstoffen beladen.

Im zweiten Schritt werden diese fluoreszierenden Kernteilchen mit einem bei den optischen Frequenzen der Anregung und Fluoreszenz metallisch leitenden Material beschichtet. Hierfür sind insbesondere Gold, Silber, Kupfer oder Aluminium geeignet. In Abhängigkeit von der Größe der Kernteilchen sind hierbei bestimmte Schichtdicken im Bereich von 1 bis 10 nm besonders bevorzugt, um maximale Photostabilität und/oder Fluoreszenzintensität zu erreichen.

Diese erfindungsgemäße Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften hängt in komplexer Weise von den Materialeigenschaften der beteiligten Stoffe (Polymermaterial und Farbstoffe), Art des metallisch leitenden Materials, den geometrischen Verhältnissen (Durchmesser der Kernteilchen und Schichtdicke des metallisch leitenden Materials) und der Art der Anregung und Emission (Ein- oder Mehrphotonenanregung) ab.

Die Beschichtung der fluoreszierenden Kernteilchen erfolgt durch Dispergieren dieser Teilchen in einem Lösungsmittel bevorzugt in wässrigem Medium, Zugabe eines Salzes oder einer anderen Verbindung des metallisch leitenden Materials und eines Reduktionsmittels.

Als Metallsalze eignen sich beispielsweise Silbersulfat, Silbernitrat, Gold(III)chlorid, Gold(I)cyanid, Kupfersulfat, Kupfernitrat. Für Silber bzw. Gold eignen sich eine Vielzahl von Reduktionsmitteln. Die folgende Aufzählung stellt eine Auswahl ohne Anspruch auf Vollständigkeit dar: Formaldehyd, Eisen(II)sulfat, Weinsäure, Hydrochinon, p-Aminophenol, Dialkylaniline, Phenidon, Sulfit, Oxalsäure, Zucker, Weinsäure, Citronensäure.

Zweckmäßigerweise werden Lösungen der Metallsalze und des Reduktionsmittels abwechselnd in kleinen Portionen zu den dispergierten Kernteilchen gegeben und Proben entnom-

men, um den Vorgang der Beschichtung zu verfolgen und zu kontrollieren. Die entnommenen Proben werden auf ihre Fluoreszenzeigenschaften im Vergleich zu den unbeschichteten Kernteilchen untersucht. Die Dicke der Beschichtung wird durch Ablösen der Metallschicht von einer definierten Anzahl von Mikroteilchen und analytische Bestimmung der Metallionenkonzentration ermittelt. Hierfür werden beispielsweise Polarographie oder Atomabsorptionsspektroskopie verwendet.

Dabei haben sich Schichtdicken des metallisch leitenden Materials im Bereich von 1 bis 10 nm und fluoreszierende Kernteilchen mit einem Durchmesser von 10 bis 90 nm als geeignet erwiesen. Besonders geeignet sind Kernteilchen deren Durchmesser 10 bis 50 nm beträgt, wenn als metallisch leitendes Material Silber verwendet wird.

In einem weiteren Arbeitsschritt kann die Oberfläche der metallisierten Teilchen modifiziert werden, um das Ankoppeln insbesondere von biologisch oder medizinisch relevanten Substanzen zu bewirken. Hierfür gibt es eine Reihe von Varianten, die separat und/oder in Kombination angewendet werden können. Durch Behandlung mit Oxidationsmitteln oder Ammoniumsulfidlösungen wird auf den metallisierten Oberflächen eine dünne Schutzschicht erzeugt. Hierfür eignen sich auch aliphatische Polysulfide oder monomere thiolgruppenenthaltende Substanzen.

Um das weitere Ankoppeln von Biomaterialien zu ermöglichen kann eine Beschichtung mit Eiweißkörpern wie Albumin oder anderen Substanzen, die funktionelle Gruppen enthalten, erfolgen. Als Beschichtungsmaterial eignen sich eine Vielzahl von monomeren oder polymeren Substanzen wie Styrol-Maleinsäure-Copolymere, Polyvinylalkohol und Polyvinylalkoholderivate, lösliche Cellulosederivate, Azide, Diazide, Chinondiazide.

Auf diese Weise können die fluoreszierenden Mikroteilchen mit funktionellen Gruppen, wie Hydroxyl, Amin, Amid, Imid, Carbonsäureanhydrid, Sulfhydryl, Sulfonat, Aldehyd, Azid, Chinonazid oder biologisch aktive Substanzen ausgerüstet werden. Für die Anwendung in der Bioanalytik ist die Beschichtung mit bzw. Ankopplung von Biotin, Avidin, Streptavidin, oder Nucleinsäureverbindungen besonders attraktiv.

Die erfindungsgemäßen fluoreszierenden Mikroteilchen werden als Fluoreszenzmarker oder Tracer verwendet. Die Verwendung als Fluoreszenzmarker benutzt dabei die Möglichkeit, daß die an den Mikroteilchen gebundenen funktionellen Gruppen oder biologisch aktiven Substanzen mit Analytsubstanzen reagieren und anschließend über eine Fluoreszenzmessung detektiert werden können.

Die übliche Vorgehensweise ist dabei folgende:

- a) Es wird eine Probe in der sich die nachzuweisenden Analytsubstanzen befinden vorbereitet.
- b) Fluoreszierende Mikroteilchen mit funktionellen Gruppen oder biologisch aktiven Substanzen ausgerüstet, die zur Erkennung der Analytsubstanzen fähig sind, werden dispergiert oder in geeigneter Weise auf eine Oberfläche aufgebracht.
- c) Die Analytsubstanzen und die fluoreszierenden Mikroteilchen werden zusammengebracht und für die benötigte Reaktionszeit inkubiert.
- d) Mikroteilchen, die nicht reagiert haben, werden entfernt.
- e) Die gebundenen Mikroteilchen und damit die Analytsubstanzen werden bestrahlt und über das abgestrahlte Fluoreszenzlicht detektiert.

Nach diesem Schema lassen sich Proteine, Peptide, DNA, RNA, Oligonucleotide, Polysaccharide, Avidin, Biotin, polymere und nichtpolymere Biomoleküle, Antikörper, Antigene, Viren oder andere Mikroorganismen nachweisen.

Das beschriebene Verfahren kann auch speziell als Immunoassay ausgestaltet werden.

Die Detektion von DNA, RNA oder Oligonucleotiden kann in der DNA-Sequenzanalyse verwendet werden.

Mit fluoreszierenden Mikroteilchen markierte Zellen können aussortiert oder cytometrisch detektiert werden.

Die erfindungsgemäßen fluoreszierenden Mikroteilchen lassen sich auch als Tracer zur Untersuchung von Transportvorgängen in fluiden Medien innerhalb und außerhalb von lebenden Organismen oder Zellen anwenden.

Die hohe Fluoreszenzintensität der erfindungsgemäßen Mikroteilchen bei Zweiphotonenanregung erlaubt eine Anregung mit preiswerten kommerziellen Diodenlasern im Bereich 600-1100 nm und die Detektion der kurzzeitig dazu emittierten Fluoreszenzstrahlung im Bereich von 300-700 nm. Wegen der hohen Fluoreszenzintensität und der verbesserten Photostabilität lassen sich mit den erfindungsgemäßen Mikroteilchen vielfach Detektionsverfahren einfacher und wirtschaftlich günstiger gestalten. Beispielsweise ist die Detektion der fluoreszierenden Mikroteilchen auch mit einer CCD-Kamera möglich.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Beispiel 1

In 250ml doppelt destilliertem Wasser werden 1g Polystyrolatexpartikel deren mittlerer Teilchendurchmesser 50 nm beträgt und die mit einem bei einer Wellenlänge von 635 nm anregbaren Cyaninfarbstoff F1 (die Formel ist unter Figure 1 angegeben) beladen sind unter intensivem Rühren dispergiert. Um diese fluoreszierenden Kernteilchen mit Silber zu beschichten, werden zwei Lösungen bereitet.

Lösung A : 2%-ige Lösung von Silbernitrat in doppelt destilliertem Wasser

Lösung B : In 250 ml doppelt destilliertem Wasser werden gelöst 2g p-Aminophenol und 10g Kaliumcarbonat

Beide Lösungen werden auf 25 Grad C temperiert.

Zu der Suspension mit den farbstoffbeladenen Latexpartikeln werden anschließend 10 ml Lösung A und 20 ml Lösung B gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 25 min werden anschließend 30 ml Reaktionsgemisch mit einer Pipette entnommen, die Latexpartikel durch zentrifugieren isoliert und drei Mal mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wird diese Prozedur mit der verbleibenden Reaktionsmischung noch vier Mal wiederholt, so daß man eine Reihe unterschiedlich mit Silber beschichteter Latexpartikel erhält. Die isolierten und gewaschenen Latexpartikel werden in 100 ml doppelt destilliertem Wasser dispergiert, um die Fluoreszenzeigenschaften bei Anregung mit der Wellenlänge 635 nm bei der Emissionswellenlänge 670 nm zu messen. Das erfolgt mittels einer herkömmlichen Fluorimeteranordnung unter Anregung mit einem Diodenlaser. Dabei dienen die nicht mit Silber beschichteten Polystyrolpartikel als Referenzobjekt. Als Photostabilität wird die Zahl der detektierbaren Fluoreszenzphotonen bis zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität auf den halben Ausgangswert (Halbwertszeit) definiert.

Nach der Messung wird die Menge des auf den Teilchen abgeschiedenen Silbers bestimmt. Dazu wird das Silber mit einer Kaliumferricyanidlösung oxidativ in Lösung gebracht und polarographisch bestimmt.

Es wurde gefunden, daß die Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften in komplexer Weise von der Größe der Kernteilchen und der Schichtdicke des aufgetragenen Silbers abhängt. Im Vergleich zu den unbeschichteten Mikroteilchen wurde eine maximale Erhöhung der Fluoreszenz um den Faktor 22 und der Photostabilität um den Faktor 100 bei einem Teilchendurchmesser von 50 nm und einer Silberschichtdicke von 6 nm gefunden.

Beispiel 2

In diesem Beispiel wird analog Beispiel 1 die Beschichtung von Mikroteilchen mit Gold und die Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften der erhaltenen Teilchen bei Einphotonenanregung bei der Wellenlänge 635 nm und Emission bei 670 nm beschrieben.

Es werden wieder 1g der farbstoffbeladenen Polystyrolmikroteilchen analog Beispiel 1 in 250 ml doppelt destilliertem Wasser dispergiert und die folgenden Lösungen bereitet:

Lösung A: 3 % ige Lösung von Tetrachlorogoldsäuretrihydrat in 1l doppelt destilliertem Wasser

Lösung B: 2,5 % ige Lösung von Kaliumcarbonat in 1l doppelt destilliertem Wasser

Lösung C: 3 ml 37 % ige Formaldehydlösung gelöst in 1l doppelt destilliertem Wasser

Zu 250 ml der Dispersion, die 1g farbstoffbeladene Polystyrolmikroteilchen analog Beispiel 1 enthält, werden 10 ml Lösung A, 8 ml Lösung B und 20 ml Lösung C gegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf 80 Grad C erwärmt und nach 10 Minuten eine Probe entnommen. Nach Zentrifugieren und Waschen werden jeweils analog Beispiel 1 die Fluoreszenzeigenschaften der goldbeschichteten Mikroteilchen bestimmt. Der Goldgehalt der Mikroteilchen wird nach Ablösen des Goldes in Königswasser wieder polarografisch bestimmt.

Durch mehrfache Wiederholung dieser Prozedur erhält man Mikroteilchen mit unterschiedlicher Goldbeschichtung.

Für Teilchen mit einem Durchmesser von 50 nm wird bei einer aufgetragenen Goldschicht von 9 nm eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um den Faktor 13 und eine Verbesserung der Photostabilität um den Faktor 60 im Vergleich zu den unbeschichteten fluoreszierenden Polystyrolpartikeln festgestellt.

Beispiel 3

Beispiel 3 beschreibt die Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften für Zweiphotonenanregung. Als Ausgangsmaterial dienten dabei Polystyrolmikroteilchen von einem Durchmesser von 50 nm die mit dem Farbstoff Rhodamin 6G beladen waren. Die Beschichtung dieser Mikroteilchen mit Silber bzw. Gold erfolgte analog Beispiel 1 und Beispiel 2.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften wurde mit einem gepulsten Diodenlaser (Pulswiederholrate 80 MHz, Pulsbreite 50 ps) auf der Wellenlänge 790 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei Wellenlängen im Bereich von 450 - 600 nm gemessen. Für Mikroteilchen mit einem Kerndurchmesser von 50 nm und einer Silberbeschichtung von 6 nm ergab sich beispielsweise eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um den Faktor 1000 gegenüber den nicht metallisierten Teilchen bei der Messung des Fluoreszenzlichts bei der Wellenlänge 460 nm. Die Photostabilität erhöhte sich für diese Mikroteilchen unter den gleichen Meßbedingungen etwa um den Faktor 2.

Für mit Gold beschichtete Teilchen wurde maximal eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um etwa den Faktor 200 gefunden für Kernteilchen mit einem Durchmesser von 50 nm und einer Goldbeschichtung von 7 nm.

Fluoreszierende Mikroteilchen

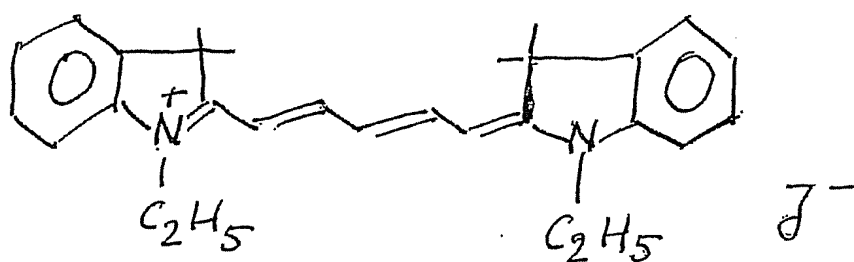
1. Fluoreszierende Mikroteilchen mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 5 bis 100 nm, wobei
 - a) die Teilchen aus einem Kern eines fluoreszierenden Materials bestehen, der mit einem bei den optischen Frequenzen der Anregung und Fluoreszenz metallisch leitenden Material derartig beschichtet ist, daß Durchmesser des Kerns des fluoreszierenden Materials, sowie Art und Schichtdicke des metallisch leitenden Materials so aufeinander abgestimmt sind, daß maximale Photostabilität und/oder Helligkeit bei Ein- und/oder Mehrphotonenanregung erreicht wird,
 - b) die Teilchen mit einer weiteren transparenten Schutzschicht versehen und
 - c) die Teilchen gegebenenfalls mit funktionellen Gruppen oder Konjugatmolekülen ausgerüstet sind, die die Ankopplung an Biomoleküle oder andere Analytsubstanzen gestatten.
2. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Kern aus einem Polymermaterial besteht, der mit fluoreszierenden Stoffen beladen ist.
3. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Polymermaterial um Polymere oder Copolymere von Styrol, Divinylbenzol, Acrylnitril oder Methacrylnitril, Acrylamid oder Methacrylamid, Acrylsäure- oder Methacrylsäureester, Butadien, Maleinsäurederivaten, Vinylacetat, Vinylchlorid, ferner Cellulosederivate, Agarose, Polyvinylalkohol, Gelatine, Polyurethan, Polyhydroxybuttersäure, Polylactide handelt.
4. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymermaterial vernetzt ist und anionen- oder kationenaustauschende Gruppen enthält.
5. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den fluoreszierenden Stoffen um organische Farbstoffe handelt.
6. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den organischen Farbstoffen um Cumarine, Oxazine, Thiazine, Rhodamine, Dibenzpyrane, Polymethine wie Cyanine, Phthalocyanine oder eine Kombination davon handelt.
7. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Kern aus Halbleiterkristallen besteht.
8. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Halbleiterkristalle aus CdS, CdSe, CdTe, ZnS, ZnSe, ZnTe, InP, InAs bestehen.
9. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem metallisch leitenden Material um Gold, Silber, Kupfer oder Aluminium handelt.
10. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Durchmesser des Kerns des fluoreszierenden Materials bevorzugt im Bereich von 10 nm bis 90 nm liegt und die Schichtdicke des metallisch leitenden Materials bevorzugt 1 bis 10 nm beträgt.

11. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Durchmesser des Kerns des fluoreszierenden Materials besonders bevorzugt im Bereich von 10 bis 50 nm liegt und das metallisch leitende Material aus Silber besteht.
12. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um sphärische Teilchen handelt.
13. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um nichtsphärische Teilchen handelt.
14. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Teilchen mit unregelmässiger bis fraktaler Oberflächenstruktur handelt.
15. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 14 dadurch gekennzeichnet, daß die transparente Schutzschicht aus Oxiden oder Sulfiden des metallisch leitenden Materials und /oder Polymeren besteht.
16. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen mit Eiweißkörpern bevorzugt Albumin beschichtet sind.
17. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 15 dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen mit aliphatischen Polysulfiden oder monomeren thiolgruppenenthaltenden Stoffen beschichtet sind.
18. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 17 oder eine Modifikation davon, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche funktionelle Kopplungsgruppen aus der Reihe Hydroxyl, Amin, Amid, Imid, Carbonsäureanhydrid, Sulfhydryl, Sulfonat, Aldehyd, Azid, Chinondiazid, enthält.
19. Fluoreszierende Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 18 oder eine Modifikation davon, gekennzeichnet dadurch, daß die Oberfläche eine biologisch aktive Substanz wie Biotin, Avidin, Streptavidin, oder eine Nucleinsäureverbindung enthält.
20. Herstellung eines fluoreszierenden Mikroteilchens nach einem der Ansprüche 1 bis 19.
21. Verfahren zur Herstellung fluoreszierender Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 20, gekennzeichnet durch folgende Arbeitsschritte
 - a) Präparation von Polymerteilchen, die fluoreszierende organische Farbstoffe enthalten oder fluoreszierenden Halbleiterkristallen mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 5 bis 100 nm,
 - b) Beschichtung von fluoreszierenden Teilchen mit einem mittleren Durchmesser von 5 bis 100 nm mit einem bei den optischen Frequenzen der Anregung und Fluoreszenz metallisch leitenden Material in der Weise, daß Durchmesser der fluoreszierenden Teilchen, sowie Art und Schichtdicke des metallisch leitenden Materials so aufeinander abgestimmt sind, daß maximale Photostabilität und /oder Helligkeit bei Ein- und/oder Mehrphotonen-anregung erreicht wird,
 - c) Beschichtung der metallisierten Teilchen mit einer weiteren transparenten Schutzschicht und gegebenenfalls weitere Beschichtung mit funktionellen Gruppen oder Konjugatmolekülen, die die Ankopplung an Biomoleküle oder andere Analytsubstanzen gestatten.

22. Verfahren zur Herstellung fluoreszierender Mikroteilchen nach Anspruch 20 und 21, dadurch gekennzeichnet, daß farbstoffbeladene hydrophobe Polymerteilchen durch Lösen der Polymere und Farbstoffe in einem organischen mit Wasser nicht vollständig mischbaren Lösungsmittel und anschließende Emulgierung in Wasser unter Zugabe grenzflächenaktiver Stoffe und Abdestillieren des organischen Lösungsmittels oder daß farbstoffbeladene hydrophile Polymerteilchen durch Lösen der hydrophilen Polymere und der Farbstoffe in Wasser, anschließende Emulgierung in einem organischen Lösungsmittel unter Zugabe grenzflächenaktiver Stoffe und Abdestillieren des Wassers präpariert werden.
23. Verfahren zur Herstellung fluoreszierender Mikroteilchen nach Anspruch 20 und 21, dadurch gekennzeichnet, daß vernetzte Polymerteilchen mit Anionen- oder Kationencharakter in Lösung mit entsprechenden ionischen organischen fluoreszierenden Farbstoffen zusammengebracht werden, so daß sich die Polymerteilchen mit Farbstoffen beladen.
24. Verfahren zur Herstellung fluoreszierender Mikroteilchen nach Anspruch 20 und 21, dadurch gekennzeichnet, daß die mit Farbstoff beladenen polymeren Teilchen oder Mikrokristalle in wässriger Suspension mit Lösungen von Salzen oder Komplexsalzen von Gold, Silber oder Kupfer in Gegenwart eines Reduktionsmittels zusammengebracht werden bis sich das Metall in der erforderlichen Schichtdicke auf den polymeren Teilchen oder Halbleiterkristallen niedergeschlagen hat.
25. Verfahren zur Herstellung fluoreszierender Mikroteilchen nach Anspruch 20 und 21, dadurch gekennzeichnet, daß eine transparente Schutzschicht aus Oxiden oder Sulfiden durch Suspension der metallisierten fluoreszierenden Polymerteilchen oder der metallisierten Halbleitermikrokristalle in wässrigen Lösungen in Gegenwart von Oxidationsmitteln oder Ammoniumsulfid aufgebracht wird.
26. Verfahren zur Herstellung fluoreszierender Mikroteilchen nach Anspruch 20 und 21, dadurch gekennzeichnet, daß die metallisierten fluoreszierenden Mikroteilchen in wässriger oder gegebenenfalls organischer Suspension mit Eiweißkörpern wie Albumin oder anderen Substanzen mit den funktionellen Gruppen Hydroxyl, Amin, Amid, Imid, Carbonsäureanhydrid, Sulfhydryl, Sulfonat, Aldehyd, Azid, Chinondiazid oder biologisch aktiven Substanzen beschichtet werden.
27. Verfahren zur Herstellung fluoreszierender Mikroteilchen nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die biologisch aktiven Substanzen Biotin, Avidin, Streptavidin oder eine Nucleinsäureverbindung sind.
28. Verwendung von fluoreszierenden Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 19, als Fluoreszenzmarker oder Tracer.
29. Verwendung von fluoreszierenden Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 19 zum Nachweis von Substanzen, die mit den funktionellen Gruppen der Mikroteilchen reagieren oder daran binden, wobei es sich um ein Protein, ein Peptid, DNA, RNA, ein Polysaccharid, ein Oligonucleotid, Avidin, Biotin, ein polymeres Biomolekül, ein nichtpolymeres Biomolekül, einen Antikörper, ein Antigen, einen Virus oder einen anderen Mikroorganismus handelt.
30. Verwendung von fluoreszierenden Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 19 in Immunoassays, in der DNS-Sequenz-Analyse, in der Zellsortierung, in Imaging-Verfahren.

31. Verwendung von fluoreszierenden Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 19, als Tracer zum Nachweis von Transportvorgängen.
32. Verwendung von fluoreszierenden Mikroteilchen nach Anspruch 29, in der Zytometrie.
33. Verwendung von fluoreszierenden Mikroteilchen nach Anspruch 29, als Tracer zum Nachweis von Transportvorgängen in lebenden Organismen oder Zellen.
34. Verwendung von fluoreszierenden Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 19 und 28 bis 33 in Meßsystemen mit Zweiphotonenanregung im Bereich von 600-1100 nm und Nachweis der Fluoreszenzemission im Bereich 300-700 nm.
35. Verwendung von fluoreszierenden Mikroteilchen nach Anspruch 1 bis 19 und 28 bis 33 und/oder 34 in Meßsystemen mit einer CCD-Kamera zur Detektion der Fluoreszenz.

Figure 1
Farbstoff F1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In national Application No
PCT/DE 02/00556

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C09K11/06	C09K11/08 C09K11/18 H01L31/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C09K H01L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRUCHEZ M JR ET AL: "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 281, 25 September 1998 (1998-09-25), pages 2013-2016, XP002125872 ISSN: 0036-8075 page 2014, column 3; figure 2 page 2015, column 3 --- -/--	1,7,8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 June 2002		27/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wengeler, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 02/00556

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DABBOUSI B O: "(CDSE)ZNS CORE-SHELL QUANTUM DOTS: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATIONS OF A SIZE SERIES OF HIGHLY LUMINESCENT NANOCRYSTALLITES" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY. B, MATERIALS, SURFACES, INTERFACES AND BIOPHYSICAL, WASHINGTON, DC, US, vol. 101, no. 46, 13 November 1997 (1997-11-13), pages 9463-9475, XP002095418 ISSN: 1089-5647 page 9463 -page 9465 -----	1-35
A	DE 199 33 104 A (KLIMANT INGO) 18 January 2001 (2001-01-18) column 2 -column 3; claims 1-23 -----	1-35
A	US 5 326 692 A (SINGER VICTORIA L ET AL) 5 July 1994 (1994-07-05) column 5; claims 1-6 column 8, line 32 -column 9, line 55 column 11, line 55 -column 13, line 45 column 13, line 46 -column 14, line 30 -----	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE 02/00556

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19933104	A	18-01-2001	DE 19933104 A1	18-01-2001
			AU 6274900 A	05-02-2001
			WO 0106227 A2	25-01-2001
			EP 1196780 A2	17-04-2002
<hr/>				
US 5326692	A	05-07-1994	AT 167511 T	15-07-1998
			CA 2113106 A1	25-11-1993
			DE 69319205 D1	23-07-1998
			DE 69319205 T2	10-12-1998
			EP 0596098 A1	11-05-1994
			JP 7508309 T	14-09-1995
			WO 9323492 A1	25-11-1993
			US 5573909 A	12-11-1996
			US 5723218 A	03-03-1998
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ☐ 1ales Aktenzeichen
PCT/DE 02/00556A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C09K11/06 C09K11/08 C09K11/18 H01L31/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C09K H01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beiz. Anspruch Nr.
X	BRUCHEZ M JR ET AL: "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 281, 25. September 1998 (1998-09-25), Seiten 2013-2016, XP002125872 ISSN: 0036-8075 Seite 2014, Spalte 3; Abbildung 2 Seite 2015, Spalte 3 ----- -/-	1,7,8



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Juni 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/06/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Wengeler, H


INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int ionalles Aktenzeichen
PCT/DE 02/00556

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DABBOUSI B O: "(CDSE)ZNS CORE-SHELL QUANTUM DOTS: SYNTHESIS AND CHARACTERIZATIONS OF A SIZE SERIES OF HIGHLY LUMINESCENT NANOCRYSTALLITES" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY. B, MATERIALS, SURFACES, INTERFACES AND BIOPHYSICAL, WASHINGTON, DC, US, Bd. 101, Nr. 46, 13. November 1997 (1997-11-13), Seiten 9463-9475, XP002095418 ISSN: 1089-5647 Seite 9463 -Seite 9465	1-35
A	DE 199 33 104 A (KLIMANT INGO) 18. Januar 2001 (2001-01-18) Spalte 2 -Spalte 3; Ansprüche 1-23	1-35
A	US 5 326 692 A (SINGER VICTORIA L ET AL) 5. Juli 1994 (1994-07-05) Spalte 5; Ansprüche 1-6 Spalte 8, Zeile 32 -Spalte 9, Zeile 55 Spalte 11, Zeile 55 -Spalte 13, Zeile 45 Spalte 13, Zeile 46 -Spalte 14, Zeile 30	1-35

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In  nationales Aktenzeichen
PCT/DE 02/00556

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19933104 A	18-01-2001	DE 19933104 A1	18-01-2001
		AU 6274900 A	05-02-2001
		WO 0106227 A2	25-01-2001
		EP 1196780 A2	17-04-2002
US 5326692 A	05-07-1994	AT 167511 T	15-07-1998
		CA 2113106 A1	25-11-1993
		DE 69319205 D1	23-07-1998
		DE 69319205 T2	10-12-1998
		EP 0596098 A1	11-05-1994
		JP 7508309 T	14-09-1995
		WO 9323492 A1	25-11-1993
		US 5573909 A	12-11-1996
		US 5723218 A	03-03-1998